Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. W. Koransky

UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG VON HEXACHLORCYCLOHEXAN-ISOMEREN IM GEHIRN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HARRY FUHRMANN
aus Obergünzburg

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. W. Koransky

UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG VON HEXACHLORCYCLOHEXAN-ISOMEREN IM GEHIRN DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HARRY FUHRMANN
aus Obergünzburg

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 29.06.1979
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.J.Portig
Correferent: Prof.Dr.Dr.J.Krieglstein

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Konzentration von 1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (HCH) in einzelnen Arealen des Rattenhirns wurde nach oraler Verabreichung der Konfigurationsisomeren alpha, beta oder gamma (= Lindan) an weiblichen Tieren gaschromatographisch bestimmt. Die Entnahme von Gewebsproben erfolgte am nativen Organ oder nach Fixierung mit Formaldehyd in situ.

Die Untersuchung führte zu folgenden Feststellungen:

1. Das Isomer alpha wies eine präferentielle Verteilung in Myelin-reiche Strukturen auf.

   Das Konzentrationsverhältnis weiße Substanz : graue Substanz betrug während der Invasionsphase bereits 4:1 und stieg im Verlauf der Evasion auf 10:1 an.

2. Die Isomeren beta und gamma erreichten Konzentrationsrelationen weiße : graue Substanz von 1:1 bzw. 2:1.

3. Die grobe regionale Verteilung der Isomeren in subcorticalen Arealen des Gehirns nach Abschluß der Invasion in das Organ entsprach bei alpha- und beta-HCH weitgehend dem Verhalten anderer lipophiler Stoffe. Bei Lindan dagegen war eine Tendenz zur Anreicherung in Corpus striatum, Hippocampus und Thalamus relativ zur Rinde festzustellen. Auch der Lindan-Gehalt des Hypothalamus war auffällig hoch.

Die Befunde werden an Hand einiger physikalisch - chemischer Eigenschaften der Isomeren sowie im Hinblick auf cerebrale Wirkungen, die sie haben, diskutiert.

Die Diskussion hat im wesentlichen das folgende Ergebnis:

1. Die Ungleichverteilung des alpha-HCH zugunsten der weißen Substanz beruht nicht auf einer Verteilung entsprechend dem Lipidgehalt sondern muß auf eine Affinität des Stoffes zu einer Komponente, oder zu Komponenten, des Myelin zurückgeführt werden.

2. Alpha-HCH hat einen erregbarkeitsmindernden (antikonvulsiven) Effekt. Dieser beruht wahrscheinlich auf einer Wirkung in zellreichen Strukturen und nicht auf der Affinität zu Myelin.

3. Die intracerebrale Verteilung des Lindan deutet auf eine relativ zu den anderen Isomeren stärkere Bindung an Zellbestandteile in subcorticalen Regionen hin.

UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG VON HEXACHLORCYCLOHEXAN-ISOMEREN IM GEHIRN DER RATTE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0068

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1. Hexachlorcyclohexan 1
2. Ausgangspunkte der Untersuchung 3
3. Ziele der Untersuchung 7

II. METHODEN

1. Substanzen 8
2. Gaschromatographische Messung von HCH 8
3. Tiere 10
4. Applikation von HCH-Isomeren 11
5. Gewinnung von Gewebsproben 11
6. Extraktion von HCH aus den Gewebsproben 16
7. Aufnahme von α-HCH in Hirngewebe in vitro 17

III. ERGEBNISSE

1. Verhalten der Tiere nach Applikation von HCH-Isomeren 19
2. Zeitlicher Verlauf der Konzentration von α-HCH in Blut und Gehirn nach einer oralen Einzeldosis 19
3. HCH-Konzentrationen im Gesamthirn zu mehreren Zeitpunkten nach oraler Verabreichung von drei Konfigurationsisomeren 22
4. Intracerebrale Verteilung von drei Konfigurationsisomeren des HCH 24 Std. nach oraler Verabreichung 24
5. HCH-Konzentration in weißer gegenüber grauer Substanz. Vergleich von drei Konfigurationsisomeren zu mehreren Zeitpunkten nach oraler Verabreichung 26
6. Aufnahme von alpha-HCH in weiße und graue Substanz in vitro 28

IV. DISKUSSION 32

V. LITERATURVERZEICHNIS 49

EINLEITUNG

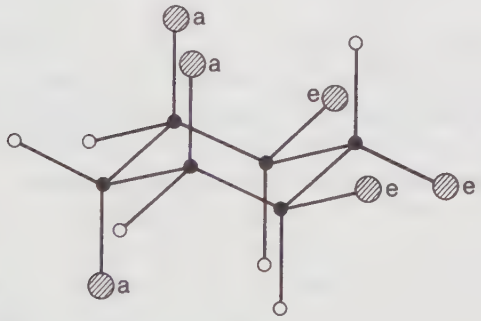
Die hier vorgelegte Arbeit beschreibt einen Teilaspekt des biologischen Verhaltens von 1, 2, 3, 4, 5, 6 - Hexachlorcyclohexan (HCH).

1. Hexachlorcyclohexan

HCH existiert in mehreren stereoisomeren Formen, die Konfigurationsisomere sind. Die Isomeren werden durch Buchstaben des griechischen Alphabets gekennzeichnet.

Abb. 1

Sterische Konfiguration von gamma-HCH
(nach van VLOTEN u.a., 1950)



● Kohlenstoff, ○ Wasserstoff, ◍ Chlor
"a"=axiale Orientierung, "e"=äquatoriale Orientierung

Abb. 1 zeigt die räumliche Anordnung des Ringes und der Substituenten in der HCH-Konfiguration gamma (Smp. 112°C). In dieser Konfiguration sind drei benachbarte Kohlenstoff-Chlor-

Tab. 1: Unterschiede zwischen Hexachlorcyclohexan-Isomeren in der Löslichkeit

Lösungsmittel	alpha-HCH	beta-HCH	gamma-HCH
Wasser [a]	69,7	6,9	254
Petroläther [b] (80 - 100°C)	1	0,2	2,9
Diäthyläther [b]	6,2	1,8	20,8
Chloroform [b]	6,3	0,3	24
Aceton [b]	13,9	10,3	43,5

a) 10^{-7} Mol/l bei 28°C (Kurihara et al., 1973)
b) g/100g bei 20°C (aus Ullmann, 1971)

Bindungen axial ("a) orientiert, die drei übrigen äquatorial ("e"). Es ist üblich, diesen Sachverhalt vereinfachend durch die Schreibweise "a,a,a,e,e,e" wiederzugeben. Analog formuliert entsprechen den HCH-Konfigurationen alpha (Smp. 158°C) und beta (Smp. 309°C) die Anordnung "a,a,e,e,e,e" und "e,e,e,e,e,e". Alle HCH-Isomere lösen sich sehr schlecht in Wasser (vgl. Tab. 1). Ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ist erheblich besser. Es bestehen jedoch beträchtliche Löslichkeitsunterschiede zwischen den Isomeren. Gamma-HCH ist generell besser löslich als das alpha-Isomere, beta-HCH generell schlechter als die beiden anderen Isomeren, die in Tab. 1 aufgeführt sind.

2. Ausgangspunkte der Untersuchung

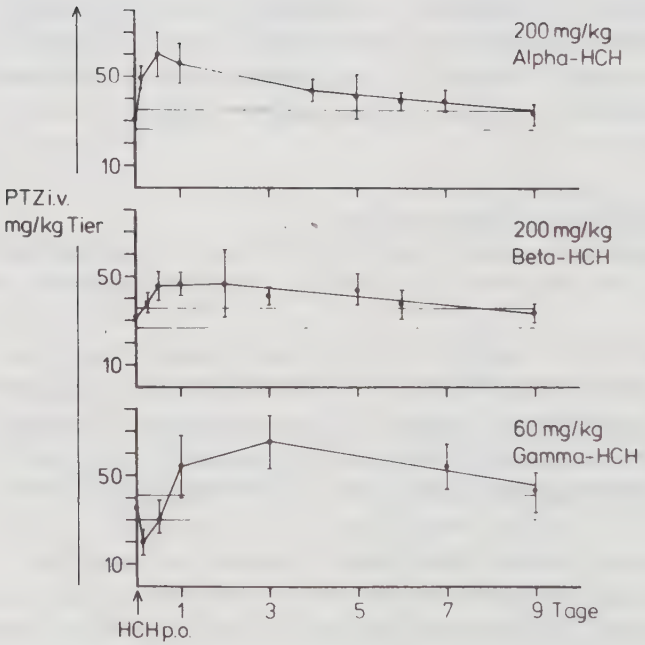
Die vorliegende Arbeit ist von einigen Tatsachen und Befunden ausgegangen, die neurologische Wirkungen von HCH-Isomeren betreffen.

2.1. Gamma-HCH erzeugt an niederen und höheren Tieren in Dosen, in denen seine Isomeren keine Verhaltensänderungen auslösen, motorische Erregung bis hin zum generalisierten Krampf. Die akute Neurotoxizität von gamma-HCH wird seit über 30 Jahren zur Bekämpfung von Schadinsekten praktisch genutzt.

Der molekulare Mechanismus dieser Wirkung, die vor über 40 Jahren zuerst beobachtet worden ist (BENDER, 1933), ist bislang nicht eindeutig geklärt. UCHIDA et al. (1975) haben am isolierten "Strickleiter"-Nervensystem von Schaben (P. americana) festgestellt, daß einem durch elektrischen Reiz transsynaptisch ausgelösten Aktionspotential in Gegenwart von gamma-HCH Nachentladungen folgen. Den gleichen Effekt lösen Hemmstoffe der Cholinesterase aus. Gamma-HCH ist jedoch kein Hemmstoff dieses Enzyms. Die Autoren vermuten, daß gamma-HCH seine Wirkung durch excessive Freisetzung von Acetylcholin auslösen könnte.

Abb. 2

Wirkungsverlust von Pentetrazol an Ratten
nach einmaliger Verabreichung von HCH-Isomeren
(nach VOHLAND u.a., 1972; VOHLAND, 1977)



Ordinaten: Dosis (mg/kg) Pentetrazol (PTZ), die bei Infusion (0,53 ml x min^{-1}) einer 0,8 %igen Lösung in eine Schwanzvene den ersten generalisierten klonischen Krampfanfall auslöst. Jeder Punkt Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens 10 Tieren. Horizontale Linien geben Bereich der an Kontrolltieren wirksamen PTZ-Dosis an.

Abszissen: Zeit in Tagen nach oraler Applikation von HCH

Der initiale Abfall der PTZ-Dosis nach Vorbehandlung mit gamma-HCH ist wahrscheinlich eine Folge der konvulsiven Wirkkomponente dieses Isomeren.

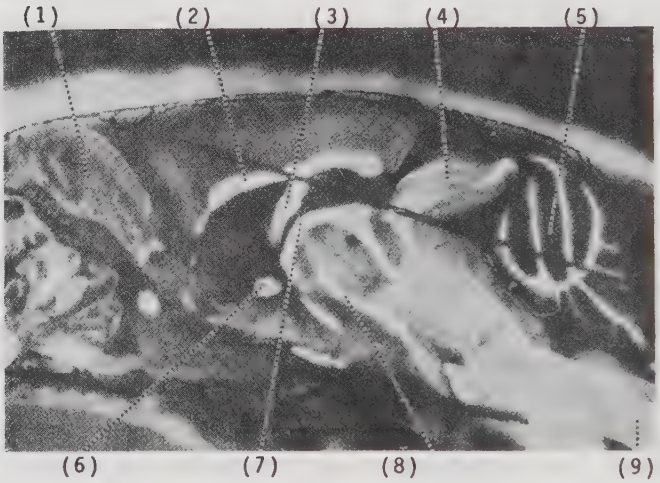
2.2. Die HCH-Isomeren alpha bis delta, d.i. auch das konvulsiv wirksame gamma-HCH, setzen an Ratten die Empfindlichkeit des ZNS gegenüber krampfauslösenden Pharmaka herab (HERKEN, 1950). Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer Quantifizierung dieses Effektes nach einmaliger Applikation von alpha-, beta- oder gamma-HCH (VOHLAND u.a., 1972; VOHLAND, 1977). Die Quantifizierung erfolgte an Hand des Wirkungsverlustes von Pentetrazol (Cardiazol^{R}), das intravenös bis zum Einsetzen generalisierter Cloni infundiert wurde. Der Mechanismus des Cardiazol-Antagonismus von HCH-Isomeren ist nicht bekannt. Extracerebrale Ursachen für sein Zustandekommen sind ausgeschlossen worden (VOHLAND und KORANSKY, 1972).

VOHLAND (1977) hat außerdem die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die HCH-Isomeren alpha, gamma und delta (Smp. 138^{o}C; Konfiguration "a,e,e,e,e,e") studiert, und zwar 24 Stunden nach oraler Verabreichung. Nach seinen Befunden sind etwa 5 µg HCH (17,2 nMol) pro Gramm Hirn eine Schwellenkonzentration für die Auslösung von Pentetrazol-Toleranz. Diese Konzentration besteht bei 130 - 160 g schweren Ratten 24 Stunden nach oraler Verabreichung von Dosen, die größer als 20 und kleiner als 50 mg/kg sind. Steigerung der HCH-Dosis bis 70 mg/kg bei gamma-HCH und bis 400 mg/kg bei alpha- und delta-HCH führt zu einer proportionalen Abnahme der Pentetrazol-Empfindlichkeit, so daß eine lineare Beziehung zwischen HCH-Konzentration und krampfauslösender Pentetrazol-Konzentration im Hirn resultiert.

2.3. KORANSKY und ULLBERG (1964) haben an Ratten die Verteilung von 14-C nach i.p. Verabreichung von 14-C-(U)-alpha-HCH untersucht mit Hilfe der Methode der Ganzkörper-Autoradiographie. Sie stellten fest, daß der Marker im ZNS der Tiere in faserreichen (weiße Substanz) gegenüber zellreichen (graue Substanz) Strukturen angereichert ist.
Abb. 3 zeigt diesen Sachverhalt.

Abb. 3

Verteilung von Kohlenstoff-14 im Gehirn der Ratte 24 Std. nach i.p. Injektion von 14-C-(U)-alpha-HCH
(nach KORANSKY und ULLBERG, 1964)



14-C-Gehalt eines Gewebsareals wird durch den Helligkeitsgrad angezeigt: Je heller ein Areal ist, desto größer ist die Strahlungsdichte.

(1) = Lobus olfactorius; (2) = Corpus callosum;
(3) = Fornix; (4) = Lamina quadrigemina;
(5) = Cerebellum; (6) = Commissura anterior
(7) = Stria medullaris thalami;
(8) = Tractus mammillo-thalamicus; (9) = Medulla oblongata.

Diese Feststellungen sind von praktischer Relevanz angesichts der Tatsache, daß die HCH-Isomeren alpha, beta und gamma infolge der weltweiten Anwendung von HCH zur Schädlingsbekämpfung und der daraus resultierenden Kontamination vieler Nahrungsmittel mit kleinen Mengen des Stoffes seit geraumer Zeit "normale" Bestandteile menschlicher Gewebe sind. Man muß aufgrund dieses Sachverhaltes annehmen, daß das menschliche ZNS heutzutage schon in sehr frühen Stadien seiner Ontogenese mit HCH kontaminiert wird. Bislang gibt es keine Anhaltspunkte für Störungen der Entwicklung des ZNS als Folge dieser Kontamination oder für dadurch verursachte Funktionsminderung im adulten Zustand. Wegen der experimentellen Schwierigkeiten, die dem präzisen Messen zahlreicher zentralnervöser Einzelleistungen am Menschen entgegenstehen, besteht jedoch keine Sicherheit darüber, daß die anhaltende Kontamination des Nervengewebes mit HCH - und anderen Fremdstoffen - tatsächlich keine diskrete Leistungsminderung mit sich bringt. Angesichts dieser Unsicherheit ist es notwendig, sich mit den neurobiologischen Effekten von HCH auseinanderzusetzen.

3. Ziele der Untersuchung

Mit der hier vorgelegten Arbeit sollten insbesondere folgende Fragen, die die oben geschilderten Befunde aufwerfen, experimentell untersucht werden:

3.1. Welcher Konzentrationsunterschied für unverändertes HCH liegt der autoradiographisch, nach Verabreichung von 14-C-(U)-alpha-HCH, festgestellten erheblichen Anreicherung von 14-C in weißer gegenüber grauer Substanz zugrunde?

3.2. Wird die Art der regionalen Verteilung von alpha-HCH im Säugetierhirn, wie sie sich in Abb. 3 darstellt, durch seine Lipophilie hinreichend erklärt?

3.3. Läßt der zeitliche Verlauf der Elimination von HCH aus grauer und aus weißer Hirnsubstanz beim Vergleich mit dem zeitlichen Verlauf der Pentetrazol-Toleranz (Abb. 2) erkennen, ob HCH an Axonen wirksam ist, wenn es die Pentetrazol-Wirkung antagonistisch beeinflußt, oder eher an Stellen synaptischen Kontakts?

3.4. Welche Konzentrationsdifferenzen zwischen weißer und grauer Hirnsubstanz erreichen das besser lösliche gamma- und das schlechter lösliche beta-Isomere?

METHODEN

1. Substanzen

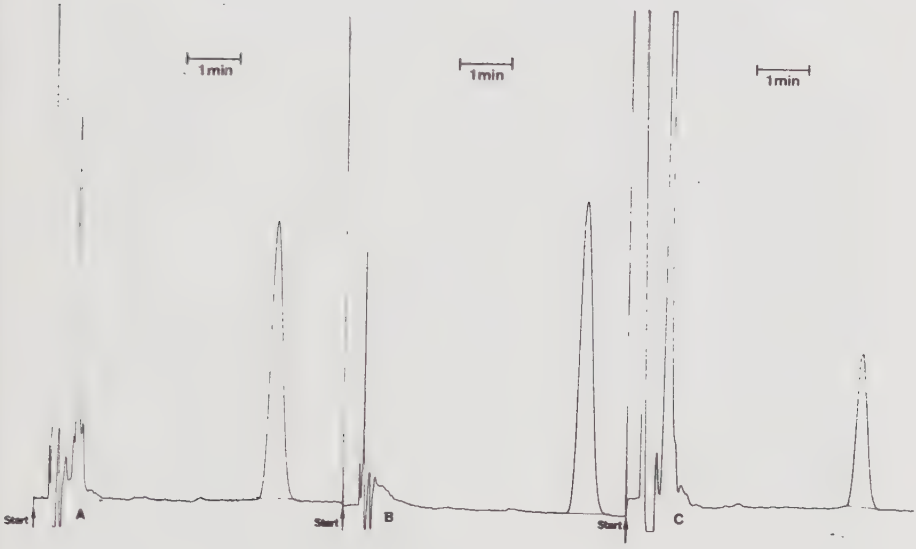
Die Isomeren alpha-, beta- und gamma des 1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (HCH) wurden von SCHERING AG, Berlin, und von BOEHRINGER SOHN, Ingelheim, in einer gaschromatographischen Reinheit $\geq$ 99 % bezogen. Verunreinigungen waren Pentachlorcyclohexene und Trichlorbenzole.

2. Gaschromatographische Messung von HCH

Es standen Hewlett-Packard-Geräte der Serie 5750, die mit 63-Ni-Elektroneneinfangdetektoren ausgerüstet waren, zur Verfügung. Als Trennflüssigkeiten wurden SE-30 oder QF-1 verwendet, 5 %ig auf silikonisiertes Kieselgur einer mesh-Zahl von 100 - 120 aufgetragen und in Stahlsäulen von 6 oder 8 Fuß Länge und einem inneren Durchmesser von 1/8 Zoll gepackt. Trägergas war Stickstoff 99,99 %, Durchfluß 40 bis 60 ml x min^{-1}. Für den Betrieb der Detektoren wurde als "Spülgas" 10 % Methan in Argon verwendet. Die Trennsäulen wurden isotherm auf 200 oder 210°C beheizt. Der Einspritzblock hatte eine Temperatur von 250°C, der Detektorblock von 280 oder 300°C. Abb. 4 zeigt Chro-

Abb. 4

Gaschromatographische Darstellung von alpha-HCH in Extrakten aus Rattenhirn



Photographie eines Ausschnittes aus einer Analysen-Serie. Detektion mittels Elektronen-Einfang. Chromatogramm-Entwicklung nach rechts.

Analyse von Extrakten aus Gewebe, entnommen 3 Stunden nach p.o. Verabreichung von 200 mg/kg alpha-HCH. Isotherme (210°C) Chromatographie auf SE-30 bei ca. 50 ml x min^{-1} Stickstoff-Durchfluß. Detektor-Bedingungen für A = B = C : 150 µsec Impulsintervall, ca. 100 ml x min^{-1} 10 % Methan in Argon. Signalverstärkung am Elektrometer: Bereich 10, Abschwächung 8.
Chromatogramm A: 1 µl Extrakt aus Corpus callosum
Chromatogramm B: 0,8 µl "Standard" = 0,8 ng alpha-HCH
Chromatogramm C: 10 µl Extrakt aus temporalem Cortex

matogramme, wie sie nach Injektion von alpha-HCH-Standard und von Extrakten aus Hirngewebe von Ratten, denen alpha-HCH appliziert worden war, erhalten wurden. Zur Analyse des HCH-Gehaltes von Gewebsextrakten wurden Volumina zwischen 0.2 und 10 µl injiziert. Die HCH-Menge wurde bestimmt durch Vergleich der erhaltenen peak-Höhe mit peak-Höhen, die durch abgemessene Volumina von HCH-Lösungen bekannter Konzentration hervorgerufen wurden. Extrakte und Vergleichslösungen wurden alternierend so eingespritzt, daß die unbekannte Menge HCH durch peaks bekannter Massen-Relation eingegrenzt war. Jede Extraktmessung wurde mindestens einmal wiederholt. Die Detektor-Signale waren nur in begrenzten Bereichen linear proportional zur Masse. Vor jeder Meßserie wurde, durch Abstimmung des Argon/Methan-Stroms mit dem Detektor-Impulsintervall, ein linearer Meßbereich empirisch festgelegt. Der Bereich lag bei den meisten Bestimmungen zwischen 1 und 4 bis 5 ng HCH, bei einigen zwischen 0.1 und 1 bis 2 ng. Die untere Nachweisgrenze für HCH lag bei 0.05 bis 0.2 ng HCH in Abhängigkeit vom Zustand des Detektors. Bei Extrakten, deren HCH-Gehalt so gering war, daß sich die peak-Höhen der Nachweisgrenze näherten, wurde die Identität des peaks dadurch kontrolliert und gesichert, daß dem Extrakt-Volumen eine bekannte Menge des zu analysierenden HCH-Isomeren zugesetzt wurde. Diese Menge wurde jeweils so abgemessen, daß sich die Höhe des zu identifizierenden peaks verdoppeln mußte.

3. Tiere

Die Versuche wurden an weiblichen Albino-Ratten eines Wistar-Stammes aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover, die 180 bis 260 g wogen, durchgeführt. Den Tieren wurde ein Standardfutter (Altromin R) und Leitungswasser ad libitum angeboten. Es wurden jeweils höchstens 4 Ratten in einem Käfig der Abmessungen 25 x 35 cm gehalten.

4. Applikation von HCH-Isomeren

Die HCH-Isomeren wurden als Lösungen in Ol. Rapae DAB mittels Schlundsonde in den Magen injiziert, und zwar mit wenigen Ausnahmen jeweils morgens zwischen 9.00 und 10.00 Uhr. Zur Herstellung der Lösungen wurde das gewünschte Mengen-Verhältnis von HCH und Rapsöl durch Wägen hergestellt. Das Gemisch wurde mit einem Magnetrührer bei Zimmertemperatur (alpha- und gamma-HCH) oder bei 50 - 70°C (beta-HCH) bis zur Lösung vermengt. Die Lösung des beta-HCH wurde vor der Verabreichung auf Handwärme abgekühlt. Die Konzentration der Lösungen (Gewicht:Volumen) betrug bei alpha-HCH 2 %, bei beta-HCH 1 %, bei gamma-HCH 0.6 %. Jedes Tier erhielt jeweils pro 100 g Körpergewicht 1 ml Rapsöl-Lösung. Beim beta-Isomeren wurde die Applikation nach 4 Stunden wiederholt. Die Dosierung betrug 200 mg/kg der Isomeren alpha und beta, 60 mg/kg des gamma-Isomeren. Sie wird im Ergebnisteil begründet. Einige Tiere erbrachen Rapsöl oder bekamen Diarrhoe. Diese Tiere wurden ausgesondert.

5. Gewinnung von Gewebsproben

5.1. Blut: Das nach Dekapitieren der Tiere aus dem Rumpf ausfließende Gemisch von arteriellem und venösem Blut wurde mit der dreifachen Gewichtsmenge Wasser hämolysiert. In einem zusätzlich durchgeführten Versuch wurde das Blut durch Zusatz von Heparin flüssig gehalten. Ein abgewogener Teil wurde, wie oben beschrieben, hämolysiert, der andere bei 3000 x g 10 min. zentrifugiert. Das gelbe Plasma wurde mit Pasteurpipetten so vollständig wie möglich abgesaugt, gewogen, und mit der doppelten Gewichtsmenge Cyclohexan extrahiert. Die Zellen wurden mit dem Dreifachen ihres Gewichts an Wasser hämolysiert.

5.2. Gesamthirn: Als "Gesamthirn" wird die im Schädelinneren incl. Occiput liegende Gewebsmasse ohne Bulbi olfactorii, Hirnnerven und Hypophyse verstanden (Zahlen der Abb. 5) oder (Zahlen der Tab. 5) diese Gewebsmasse nach Abtragen von 5 - 10 mg Cortex sowie des durch die Zentralfissur zugänglichen medianen Stücks des Balkens. Das Gewebe wurde in der dreifachen Gewichtsmenge Wasser mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert.

5.3. Areale aus nativem Hirn: Für die vergleichende Messung des HCH-Gehaltes von zellreichen und faserreichen Arealen wurden dem frischen Hirn nach Abspülen von Blutresten mit Kochsalzlösung folgende Gewebsstücke entnommen:

(1) flache Schnitte von der Konvexität der parietalen und der temporalen Rinde, mit Hilfe eines Stereomikroskopes so abgetragen, daß auf der Unterseite der Schnitte keine weiße Substanz erkennbar war;

(2) der durch die Zentralfissur zugängliche mediane Abschnitt des Balkens;

(3) 2 - 3 mm lange Abschnitte der Tractus und der Nervi optici.

Tab. 2 zeigt das Ergebnis einer Analyse des Lipidgehaltes von Hirnrindenschnitten und von Stückchen des Balkens, wie sie im Verlauf der Untersuchungen gewonnen wurden. In guter Übereinstimmung mit den Befunden anderer Untersucher (z.B. FOLCH-PI u. LE BARON, 1957) enthielten die Rindenschnitte 5,3 und die Portionen des Balkens 17,2 Gewichtsprozent Lipide. Die nomenklatorische Kennzeichnung insbesondere der analysierten Hirnrindenschnitte als graue Substanz war somit gerechtfertigt.

Tab. 2:

Lipidgehalt von Rinde und Balken aus Rattenhirn
Vergleichende Bestimmung zur Kontrolle der Präparation von Rindenschnitten

	Frischgewicht des Gewebes mg	Trockengewicht des extrahierten Lipids mg	Lipidgehalt des Gewebes mg/g
Rinde	226.57	12.10	53.4
Balken	125.34	21.51	171.6

Das Gewebe wurde den Hirnen von insgesamt 17 adulten Ratten beiderlei Geschlechts in nativem Zustand entnommen. Flache Schnitte von der Hirnrinde und Portionen des Balkens wurden zu je einem "pool" vereinigt. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes wurde das Gewebe zunächst in je 1 ml Wasser viermal nacheinander tiefgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde viermal nacheinander mit je 4 ml Chloroform/Methanol 2 : 1 (v/v) jeweils 30 min. extrahiert. Die Extrakte wurden eingeengt und die verbleibenden Rückstände bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

5.4. Areale aus formaldehydfixiertem Hirn: Die Fixierung erfolgte in situ durch Perfusion des Schädels mit 10 ml einer Verdünnung 1 + 9 von Formalin in 0,9 % NaCl. Dazu wurde eine Carotis communis in Äthernarkose aus ihrer Bindegewebshülle freigelegt und unter Schonung des Vagus kanüliert. Die Formaldehydlösung wurde langsam in das Gefäß gedrückt und dann auf der Gegenseite die große Halsvene eröffnet.

Außer den bereits oben genannten Arealen wurden dem fixierten Hirn die folgenden Gewebsproben entnommen (vgl. Abb. 5):

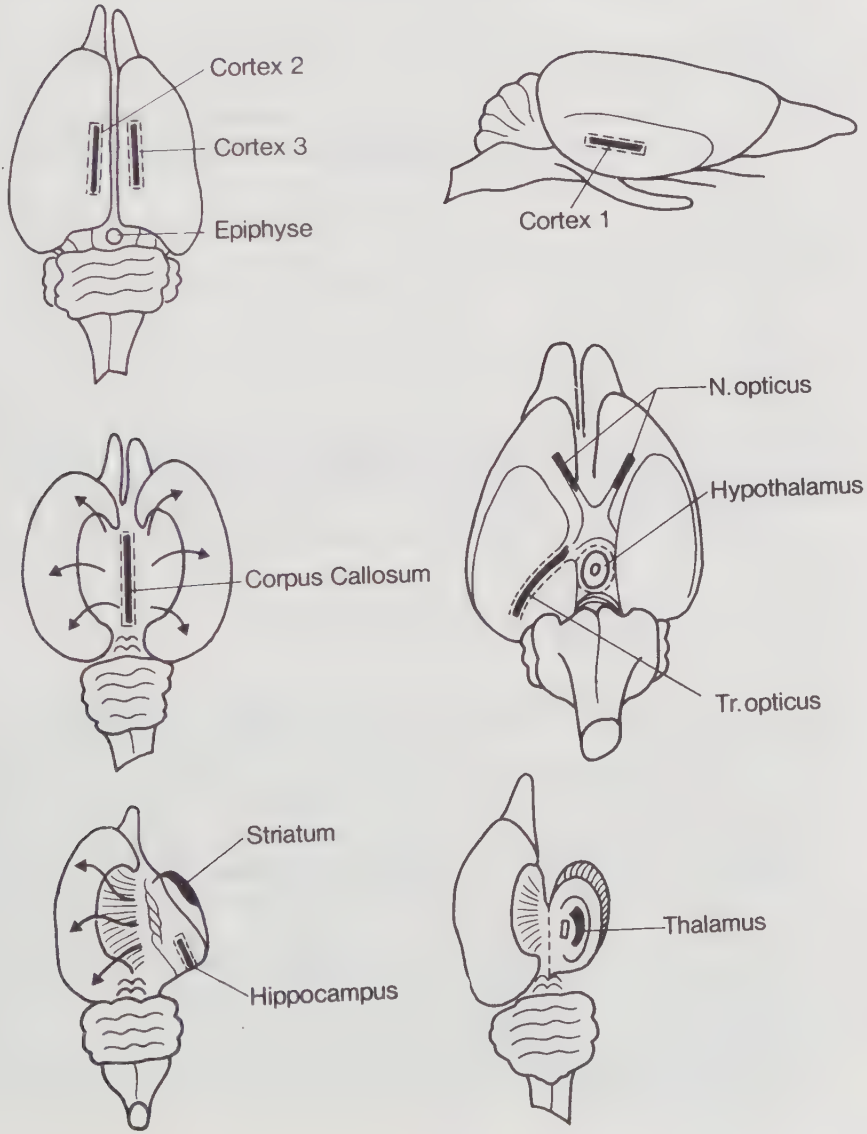
(4) die Epiphyse;
(5) die aus der Durahülle herausgelöste Hypophyse;
(6) durch einen kegelförmigen Schnitt zwischen Corpora mammillaria und Chiasma opticum ein Stück des Hypothalamus;
(8) nach Eröffnen eines Seitènventrikels von der Mittellinie her je ein Stück (incl. Ependym) vom Corpus striatum und vom dorsalen Hippocampus;
(9) nach Eröffnen des dritten Ventrikels ein Stück aus dem medialen, an die Massa intermedia angrenzenden Thalamus.

Die Gewebsproben aus nativem und fixiertem Hirn wurden auf Filterpapier vorsichtig von anhaftender Feuchtigkeit befreit und in tarierten Eppendorf-Zentrifugen-Töpfchen gewogen. Das Frischgewicht betrug zwischen 0,5 und 10 mg. Die Proben kamen dann in einem auf -18°C temperierten Raum.

In Kontrollversuchen mit alpha-HCH wurde geprüft, ob nach Formaldehydfixierung des Gewebes Analysenergebnisse erhalten wurden, die von Resultaten der Untersuchung an nativem Gewebe abwichen. Dazu wurden Areale vergleichend analysiert, die auch am frischen Hirn reproduzierbar präpariert werden können. Der Vergleich erbrachte übereinstimmende Werte (Tab. 3). Es wurde deshalb angenommen, daß bei der Analyse einzelner subcorticaler Strukturen aus formaldehydfixiertem Rattenhirn HCH-Konzentrationen gemessen wurden, die denen entsprachen, die im nichtfixierten Zustand vorlagen.

Abb. 5

Skizzen zur Verdeutlichung des Präparationsganges



Tab. 3:

Konzentration von alpha- Hexachlorcyclohexan in der Hirnrinde und in einigen faserreichen Hirnstrukturen. Vergleichende Messung an nativem und fixiertem Gewebe

	Konzentration (pMol/mg) gemessen an nativem Gewebe	fixiertem Gewebe
Hirnrinde	180,3 ± 24,7 (7)	188,8 ± 27,2 (21)
Faserreiche Strukturen	661,4 ± 58,0 (11)	669,2 ± 68,4 (19)

Untersuchung 24 Std. nach oraler Applikation von 690 nMol/g. Fixierung durch Perfusion des Kopfes mit Formaldehydlösung. Faserreiche Strukturen waren Corpus callosum sowie Tractus und Nervus opticus. Zahlen in Klammern = Zahl der untersuchten Gewebsproben. Zahl der Tiere: 10 fixiert; 6 nicht fixiert.

6. Extraktion von HCH aus Gewebsproben

6.1. Blut und Gesamthirn. Von jedem Hämolysat und jedem Hirnhomogenat wurden 2 - 3 g in ein Zentrifugenglas gewogen und mit je 10 ml n-Hexan oder Cyclohexan 30 min lang bei Raumtemperatur in einem vertikal rotierenden Extraktionsapparat äquilibriert. Nach kurzem niedrigtourigen Zentrifugieren wurden 3 oder 5 ml der organischen Phase abgenommen und bis zur Messung des HCH-Gehaltes am Gaschromatographen bei 4°C aufbewahrt.

Zu Hämolysat oder Hirnhomogenat von Kontrolltieren zugesetztes HCH (36 oder 72 nMol) wurde mit folgender Ausbeute im Extrakt wiedergefunden: Blut 98,3 ± 13,1 % (N =8)
Hirn 85,6 ± 13,2 % (N =16).
Die im Ergebnisteil genannten Zahlen sind nicht korrigiert für diesen Verlust.

6.2. Hirnareale. Die in Eppendorf-Töpfchen bei -18°C aufbewahrten Proben wurden nach frühestens 3 Stunden auf Raumtemperatur gebracht, mit 400 µl (für Analysen auf alpha-HCH) oder 200 µl (für Analysen auf beta- oder gamma-HCH) Cyclohexan überschichtet und anschließend mit einem batteriegetriebenen Teflon-Pistill, das dem konisch zulaufenden Boden der Zentrifugentöpfchen angepaßt war, zerkleinert. Um während dieses Vorgangs etwa eintretenden Verlust von Cyclohexan nicht zu übersehen, wurden die Töpfchen davor und danach gewogen. Die Töpfchen wurden dann in der Kälte aufbewahrt, zunächst wiederum bei -18°C für einige Stunden, danach bei 4°C. Vor der Entnahme von Cyclohexan zur gaschromatographischen Analyse des HCH-Gehaltes wurden die Töpfchen 3 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und bis zur Messung in einen Kühlschrank gestellt. Bei diesem Verfahren wurde HCH, das den Gewebsproben als konzentrierte Lösung in Äthanol zugesetzt wurde, vollständig zurückgewonnen. Die Kontrolle erfolgte für jedes der drei untersuchten Isomeren für jeweils zwei verschiedene Mengen an jeweils 6 Proben von Cortex und an 6 Proben von weißer Substanz. Die eingesetzten Mengen waren so abgemessen, daß nach Zusatz von 200 resp. 400 µl Cyclohexan eine Soll-Konzentration von 1,25 oder 5,0 ng/µl entstehen mußte.

7. Aufnahme von alpha-HCH in Hirngewebe in vitro

Schnitte von Hirnrinde und Portionen des Balkens wurden mit einer wässrigen Lösung von alpha-HCH inkubiert, um die Aufnahme der Substanz in diese beiden Gewebsarten zu untersuchen. Zur Inkubation wurde ein Medium folgender Zusammensetzung (pH 7,0) verwendet: Na_2HPO_4 2mM, NaH_2PO_4 2mM, $NaHCO_3$ 5mM, Glukose 10 mM, Na 142 mVal (Differenz als NaCl), K 3,5 mVal (als KCL), Ca 2,5 mVal (als $CaCl_2$), Mg 2,2 mVal (als $MgCl_2$). Die Inkubation erfolgte in 25 ml Erlenmeyerkölbchen mit je 3 ml Medium. Die Kölbchen wurden in einem Wasserbad von 37°C mit niedriger Frequenz horizontal bewegt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß 1 µg alpha-HCH pro ml Medium diejenige Konzentration war, bei der während 4 Stunden Inkubation unter den genannten Bedingungen kein Verlust an HCH durch Verdampfen oder durch Adsorption an das Glas eintrat.

Die Gewebeschnitte bzw. -portionen wurden auf Filterpapier vorsichtig von anhaftender Feuchtigkeit befreit und auf tarierten Quadraten von Aluminiumfolie gewogen. Rindenschnitte wurden nach der Wägung in kleine, mit Medium gefüllte Plexiglaswannen gelegt, auf deren Unterseite Millimeterpapier geklebt worden war, so daß der Umfang der Schnitte näherungsweise abgelesen werden konnte. Schnitte mit einer Relation Gewicht : Fläche ($mg:mm^2$) $>0,6$ wurden nicht verwendet.

Während der Inkubation wurden zur Kontrolle der HCH-Konzentration zu folgenden Zeitpunkten jeweils 100 µl Medium entnommen: 0,5, 1, 2 und 4 Stunden. Das entnommene Volumen wurde in engen Schliffzentrifugengläsern mit dem gleichen Volumen Cyclohexan unter mäßigem Schütteln extrahiert. Der HCH-Gehalt der organischen Phase wurde gaschromatographisch bestimmt.

Nach 4 Stunden Inkubation wurden die Gewebsstückchen mit einer Pinzette herausgenommen und mit Filterpapier das anhaftende Medium abgesaugt. Nach Wägung auf Aluminiumfolie wurden die Proben dann in der im vorausgegangenen Abschnitt beschriebenen Weise in Eppendorf-Töpfchen mit Cyclohexan extrahiert zur gaschromatographischen Bestimmung ihres HCH-Gehaltes.

ERGEBNISSE

1. Verhalten der Tiere nach Applikation von HCH-Isomeren

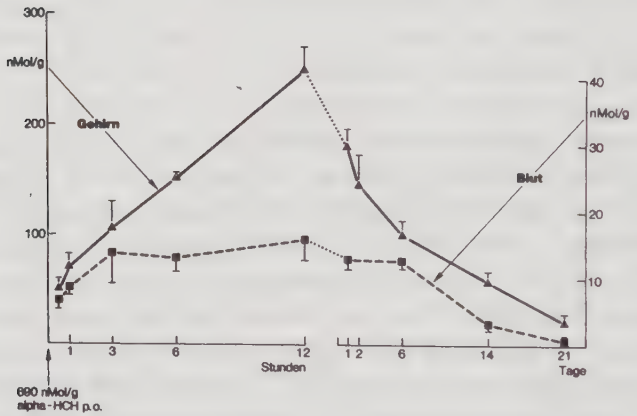
Die Isomeren alpha und beta wurden in der Dosis (200 mg/kg entsprechend 690 nMol/g) appliziert, für die der zeitliche Verlauf des Effekts der Pentetrazol-Toleranz bekannt war (VOHLAND u.a., 1972; VOHLAND, 1977, vgl. Abb. 2). Ratten, die diese Dosis alpha- oder beta-HCH erhalten hatten, waren in ihrem Verhalten von Kontrolltieren kaum zu unterscheiden. Gamma-HCH mußte niedriger dosiert werden, denn 200 mg/kg dieses Isomeren sind für Ratten eine tödliche Dosis. Nach Untersuchungen von VOHLAND (1977) lösen jedoch 60 mg/kg (entsprechend 205 nMol/g) gamma-HCH eine signifikante Toleranz gegenüber intravenös infundiertem Pentetrazol aus (siehe Abb. 2). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb diese Dosis verabreicht. 60 mg/kg gamma-HCH hatten folgende Wirkungen auf das Verhalten der Tiere: 30 bis 60 min nach der Injektion in den Magen setzten bei allen Ratten klonische Muskelkontraktionen ein, die über einige Stunden hin wiederholt auftraten. Frequenz und Intensität der Cloni waren interindividuell verschieden, aber generell niedrig. Tonische Muskelkontraktionen wurden nicht beobachtet. Jedoch waren die spontane und die reaktive motorische Aktivität der Tiere für zwei bis drei Tage gegenüber dem Verhalten unbehandelter Ratten merklich erhöht.

2. Zeitlicher Verlauf der Konzentration von alpha-HCH in Blut und Gehirn nach einer oralen Einzeldosis

Als Grundlage für die vergleichende Untersuchung des pharmakokinetischen Verhaltens von verschiedenen Konfigurationsisomeren wurde in einer ersten Versuchsreihe die Invasion des alpha-Isomeren in Blut und Gehirn sowie seine Evasion aus diesen Organen nach der oralen Verabreichung einer Einzeldosis näher untersucht. Das Ergebnis der dazu durchgeführten Messungen ist in Abb. 6 dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß sich die initiale Vertei-

Abb. 6

Zeitlicher Verlauf der Konzentration von alpha-HCH (nMol/g) in Gehirn und Blut von weiblichen Ratten nach oraler Verabreichung von 200 mg/kg



Jeder Punkt ist Mittelwert (mit Standardabweichung) von 4 Tieren. Die Skaleneinteilung der Ordinaten (links: Gehirn; rechts: Blut) ist unterschiedlich.

lung von alpha-HCH in die Strukturen des zentralen Nervensystems über mindestens 12 Stunden erstreckte, aber vor Ablauf von 24 Stunden abgeschlossen war. Man kann der Abbildung außerdem entnehmen, daß der Konzentrationsquotient Hirn : Blut bereits nach 30 min größer war als Eins und im Verlauf der weiteren Invasion auf die Größe 15 zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Applikation zunahm. Der Prozeß der Elimination vollzog sich außerordentlich langsam und war auch nach drei Wochen noch nicht abgeschlossen. Wegen des lipophilen Charakters der Substanz wurde geprüft, wie sie sich im Blut zwischen Zellen und Plasma verteilt. Eine orientierende Untersuchung zum Zeitpunkt 24 Stunden ergab (s. Tab. 4) keine Anreicherung in den Zellen. Das Plasma enthielt 42 - 43 % des im Vollblut nachweisbaren alpha-HCH.

Tab. 4:

Verteilung von alpha-HCH zwischen Zellen und Plasma im Blut von Ratten 24 Stunden nach oraler Verabreichung von 690 nMol/g

(Resultat von Parallelbestimmungen an 12,7 g Blut von 3 weiblichen Ratten 160 - 170 g)

	Konzentration	Verteilung [1]	
		absolut	relativ
	(nMol HCH/g)	(nMol HCH)	(%)
Vollblut:	33,7	67,4	100
Plasma:	26,1	28,7	42,6
Zellen:	38,8	34,9	51,8

1) Angabe für 2 g Vollblut mit 1,1 g Plasma und 0,9 g Zellen

3. HCH-Konzentrationen im Gesamthirn zu mehreren Zeitpunkten nach oraler Verabreichung von drei Konfigurationsisomeren

Von dem in Abb. 6 dargestellten Untersuchungsergebnis ausgehend wurden einige Zeitpunkte für die vergleichende Messung der HCH-Konzentration des Gehirns nach oraler Verabreichung der Konfigurationsisomeren alpha, beta und gamma festgelegt. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, daß eine Beurteilung der Invasion in das Organ sowie des zeitlichen Verlaufs der Elimination aus dem Organ möglich sein sollte. Tab. 5 enthält das Ergebnis dieser vergleichenden Prüfung. Die für alpha-HCH ermittelten Konzentrationen stimmen gut überein mit dem Resultat der in Abb. 5 dargestellten Versuchsreihe sowie mit Messungen von VOHLAND u.a. (1972)
24 Stunden nach Injektion von 690 nMol/g Tier in den Magen enthielt des Gehirns wiederum durchschnittlich 180 nMol der Substanz pro Gramm Feuchtgewicht. Der Gehalt des Organs an gamma-HCH war geringer für den gleichen Zeitpunkt, jedoch entsprach die Differenz zum alpha- Isomeren ziemlich genau dem Unterschied in der Dosis. Während demnach die initiale Verteilung des gamma-HCH in das Gehirn der Tiere derjenigen des alpha-HCH quantitativ vergleichbar zu sein und ähnlich abzulaufen schien, war der Anteil der Dosis des beta-HCH, der initial in die Strukturen des zentralen Nervensystems gelangte, überraschend gering, um den Faktor Fünf kleiner als bei den beiden anderen Isomeren. Auch 48 Stunden nach der Verabreichung war der Gehalt des Hirns an beta-HCH ebens niedrig. Der Konzentrationsunterschied zwischen den Isomeren beta und alpha, die in gleicher Dosis appliziert worden waren, hatte daher wahrscheinlich einen anderen Grund als den, daß die initial Verteilung des beta-HCH nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen war.

Hinsichtlich der Elimination aus dem Organ unterschieden sich alle drei Isomeren. Am schnellsten sank die Konzentration des gamma-HCH ab, und zwar zwischen Tag 1 und 7 nach der Applikation um 90 %. Bei alpha-HCH dagegen betrug die Abnahme im gleichen Zeitraum nur knapp 40 %, bei beta-HCH sogar nur etwa 15 %.

Tab. 5:

Konzentration von Hexachlorcyclohexan im Gehirn der Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Verabreichung von drei Konfigurationsisomeren. Unterschiede in der initialen Verteilung in das Organ und in der Elimination aus dem Organ.

Dosierung der Isomeren: alpha- und beta- 200 mg/kg (690 nMol/g); gamma- 60 mg/kg (205 nMol/g). Zahl in Klammern = Zahl der untersuchten Tiere.

Zeitpunkt nach oraler Verabreichung	Hexachlorcyclohexan (nMol/g) im Gehirn		
	Alpha-Isomeres	Beta-Isomeres	Gamma-Isomeres
3 Stunden	147 ± 15,4 (10)	39 ± 4,4 (4)	26 ± 3,9 (6)
24 Stunden	181 ± 11,0 (10)	33 ± 2,5 (4)	53 ± 4,7 (10)
48 Stunden		32 ± 1,3 (4)	
7 Tage	110 ± 13,8 (11)	28 ± 4,0 (4)	6 ± 1,1 (5)
14 Tage	42 ± 4,2 (6)	22 ± 2,1 (4)	

4. Intracerebrale Verteilung von drei Konfigurationsisomeren des HCH 24 Stunden nach oraler Verabreichung

Nach dem Ergebnis der eben beschriebenen Versuchsreihen war die initiale Verteilung von HCH in das zentrale Nervensystem 24 Stunden nach der Applikation weitgehend oder sogar endgültig abgeschlossen. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb für eine vergleichende Untersuchung der regionalen Verteilung der drei Isomeren in diesem Organ gewählt.

Zehn Hirnregionen wurden analysiert. Ihre Auswahl geschah nach folgenden Gesichtspunkten:
Flache Schnitte von der Hirnrindenoberfläche sollten gut durchblutetes Gewebe grauer Substanz repräsentieren, also Gewebe, das reich an Nervenzell-Somata und an synaptischen Strukturen ist, der Balken und die leicht zugänglichen Abschnitte der Sehbahn dagegen weiße Substanz, also Gewebe, das überwiegend aus markscheidenumhüllten Axonfortsätzen besteht. Als funktionell wichtige subcorticale Strukturen, die in unterschiedlichem Grade weiße neben grauer Substanz enthalten, wurden kleine Teilbezirke des Corpus striatum, des Thalamus, des Hippocampus und des Hypothalamus analysiert. Hypophyse und Epiphyse wurden in die Untersuchung einbezogen, weil diese Drüsen Abschnitte enthalten, in denen keine Blut-Hirn-Schranke besteht, die Kapillaren also "normale" Durchlässigkeit besitzen.

Tabelle 6 gibt an, in welchen Konzentrationen die drei Konfigurationsisomeren 24 Stunden nach ihrer Verabreichung in den für diese Untersuchung ausgewählten Hirnstrukturen vorgefunden wurden. Die wesentlichen Feststellungen sind außerdem in Abb. 7 dargestellt. Alle drei Substanzen erreichten im Verlauf ihrer Invasion ins Gehirn eine gegenüber der Hirnrinde höhere Konzentration in den Fasern des Balkens und der Sehbahn. Die Größe der Konzentrationsdifferenz war jedoch nicht gleich. Als Konzentrationsquotient weiße Substanz : graue Substanz ausgedrückt, war der Unterschied beim alpha-Isomeren von der Größe 3,5, beim gamma-Isomeren dagegen nur von der Größenordnung 2, beim beta-Isomeren sogar nur wenig größer als 1. Striatum, Thalamus und Hippocampus enthielten zum untersuchten Zeitpunkt signifikant mehr gamma-HCH als die temporale und parietale Rinde. Demgegenüber wurde von alpha-HCH in den ge-

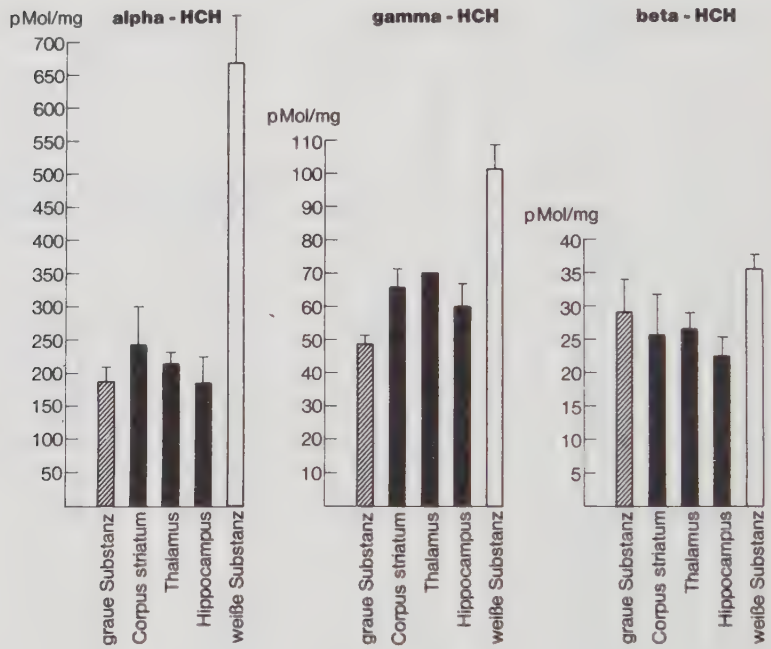
Tab. 6:

Konzentration von Hexachlorcyclohexan in einigen Teilstrukturen des Rattenhirns 24 Stunden nach oraler Verabreichung von drei Konfigurationsisomeren. Unterschiede in der regionalen Verteilung der Isomeren.

Dosierung der Isomeren: alpha- und beta- 690 nMol/g; gamma- 205 nMol/g. Hirn in situ fixiert mit Formaldehyd. Details der Präparation siehe Abbildung 5. Zahl in Klammer = Zahl der untersuchten Tiere.

	Gewebskonzentration (pMol/mg)		
	Alpha-HCH	Beta-HCH	Gamma-HCH
Cortex a) temporal ...	178,0 ± 7,2 (9)	30,0 ± 7,1 (4)	47,6 ± 1,8 (4)
b) parietal ...	198,0 ± 34,9 (9)	28,5 ± 3,0 (4)	49,1 ± 2,5 (4)
Corpus callosum	689,2 ± 91,7 (5)	34,4 ± 6,9 (4)	95,8 ± 6,9 (4)
Tr. opticus	632,0 ± 69,9 (6)	37,3 ± 2,2 (3)	109,3 ± 6,2 (3)
N. opticus	687,6 ± 49,9 (8)	34,5 ± 2,6 (3)	100,2 ± 9,8 (4)
Corpus striatum	224,1 ± 66,9 (8)	25,4 ± 6,2 (4)	65,7 ± 5,6 (4)
Thalamus	214,2 ± 16,2 (9)	26,7 ± 4,9 (3)	75,9; 65,7
Hippocampus	184,5 ± 39,7 (8)	22,5 ± 5,5 (4)	60,2 ± 6,7 (4)
Hypothalamus	123,1 ± 17,3 (8)	19,5 ± 3,0 (3)	44,7 ± 4,0 (4)
Hypophyse	102,2 ± 4,6 (5)	23,1 ± 5,1 (4)	35,9 ± 1,3 (4)
Epiphyse	292,7 ± 45,3 (10)	25,8 ± 2,3 (4)	98,3 ± 9,5 (4)

Abb. 7 HCH-Isomere in grauer und weißer Substanz und in drei Subcorticalen Strukturen des Rattenhirns.



Konzentrationen (pMol/mg) aus Tab. 6.

Graue Substanz: Arithmet. Mittel und Standardabweichung aller Messungen an temp. und pariet. Cortex.
Weiße Substanz: Arithmet. Mittel und Standardabweichung aller Messungen an Corpus Callosum, Tr. und N. opticus.

Bei gamma-HCH ist der Konzentrationsunterschied zwischen Cortex und Subcorticalen Strukturen statistisch sicher ($p < 0{,}025$).

nannten subkontikalen Strukturen etwa die gleiche Konzentration wie im Cortex gefunden, während die Zahlen für beta-HCH eine Tendenz zu geringerer Anreicherung in den drei Kernregionen, verglichen mit der Rinde, andeuten. Im Hypothalamus waren sowohl alpha- wie auch beta-HCH in signifikant niedrigerer Konzentration enthalten als im Cortex.

Im Unterschied hierzu wich der Gehalt dieser Struktur an gamma-Isomeren von dem der Rinde kaum ab.
In der Hypophyse wurden alle drei Isomeren in Konzentrationen vorgefunden, die signifikant unter denen im Cortex lagen.
Dagegen enthielt die Zirbeldrüse etwa doppelt so viel alpha-HCH und gamma-HCH wie die Hirnrinde, vom beta-Isomeren jedoch eine angenähert gleiche Menge pro Gewichtseinheit.

5. HCH-Konzentration in weißer gegenüber grauer Substanz. Vergleich von drei Konfigurationsisomeren zu mehreren Zeitpunkten nach oraler Verabreichung

Die Löslichkeitseigenschaften der Verbindung hatten es möglich erscheinen lassen, daß Strukturen weißer Substanz des Gehirns wegen ihres höheren Lipidgehaltes mehr HCH aufnehmen würden als Strukturen grauer Substanz. Es war deshalb überraschend, daß sich die Konfigurationsisomeren in dem Grad, den die Konzentrationsdifferenzen gegen Ende des initialen Verteilungsvorganges erreichten, voneinander erheblich unterschieden. Aus diesem Grunde wurde es für sinnvoll gehalten, festzustellen, welche Konzentrationsunterschiede zu anderen Zeitpunkten, d. i. während der Invasion und während der Elimination, bestehen. Tab. 7 gibt das Ergebnis der vergleichenden Analyse des HCH-Gehaltes dieser Strukturen in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Die Zahlen für den Zeitpunkt 24 Stunden nach Applikation stammen zu einem Teil aus der Versuchsreihe, deren Resultat bereits erörtert worden ist (vgl. Tab. 6).

Tab. 7:

Konzentration von Hexachlocyclohexan in Strukturen grauer und weißer Substanz des Rattenhirns zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Verabreichung von drei Konfigurationsisomeren.

Dosierung der Isomeren: alpha- und beta- 690 nMol/g; gamma- 205 nMol/g. Untersuchung an nativem Gewebe. Graue Substanz: Flache Schnitte vom parietalen und vom temporalen Cortex. Weiße Substanz: Corpus callosum sowie Tr. und N. opticus. Zahl der untersuchten Tiere über, der untersuchten Gewebsproben hinter den Konzentrationsangaben.

	Gewebskonzentration (pMol/mg)				
	3 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	7 Tage	14 Tage
Alpha-HCH	(6)	(10)		(6)	(6)
Graue S.	97,6 ± 23,3 (16)	186,7 ± 26,1 (20)		89,1 ± 15,2 (16)	28,8 ± 4,7 (12)
Weiße S.	416,0 ± 60,2 (18)	669,0 ± 68,5 (19)		607,0 ± 59,6 (18)	285,4 ± 32,2 (16)
Beta-HCH	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
Graue S.	42,8 ± 9,3 (12)	28,7 ± 4,6 (10)	25,5 ± 3,8 (10)	26,0 ± 4,5 (11)	15,8 ± 3,1 (4)
Weiße S.	19,5 ± 3,8 (10)	36,1 ± 4,4 (10)	30,3 ± 4,4 (10)	27,8 ± 6,3 (9)	21,6 ± 2,0 (4)
Gamma-HCH	(6)	(4)		(4)	
Graue S.	17,6 ± 6,8 (16)	48,6 ± 2,3 (12)		5,2 ± 1,1 (14)	
Weiße S.	27,5 ± 8,4 (18)	99,9 ± 10,3 (11)		11,9 ± 1,1 (12)	

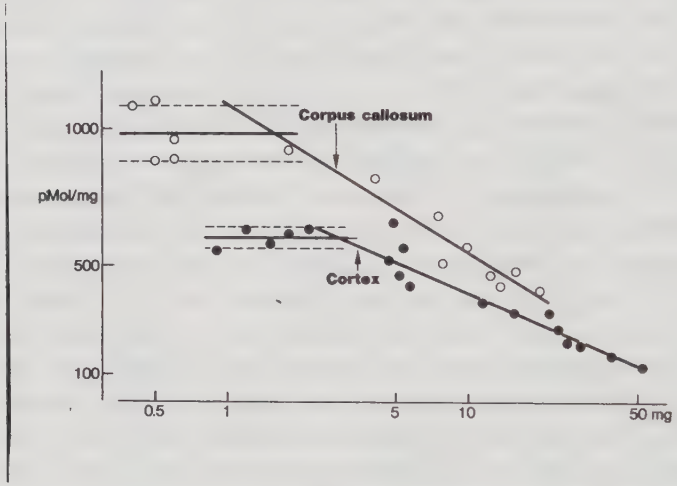
Die Zusammenstellung zeigt, daß das differente Verhalten der drei Konfigurationsisomeren, das einen Tag nach der oralen Verabreichung festgestellt worden war, generell auch vor und nach diesem Zeitpunkt bestand. Der Konzentrationsquotient weiße Substanz : graue Substanz erreichte für alpha-HCH die Größe 4 bereits drei Stunden nach der Applikation und stieg während der Elimination im Verlauf der ersten und zweiten Woche sogar allmählich bis auf 10 an, weil der Konzentrationsabfall in weißer Substanz langsamer erfolgte als in grauer Substanz. Beim gamma-Isomeren dagegen war das Konzentrationsverhältnis sowohl während der Invasion als auch im Verlauf der Elimination von der Größenordnung 2. Insbesondere schien die Elimination dieses Isomeren aus Strukturen grauer und weißer Substanz in dem Zeitraum, der erfaßt worden ist, nahezu gleichförmig zu erfolgen. Die Meßergebnisse für beta-HCH deuten an, daß die Invasion dieses Isomeren in Strukturen der Hirnrinde schneller erfolgte als die Invasion in Fasern des Balkens und der Sehbahn. Gegen Ende der Invasion und im Verlauf der Elimination, soweit dieser Vorgang verfolgt wurde, enthielten die untersuchten Strukturen weißer Substanz mehr beta-HCH als die Hirnrinde, allerdings war die Konzentrationsdifferenz zu keinem Zeitpunkt so groß wie bei gamma- oder alpha-HCH. Die Untersuchung erfaßte erkennbar nur die initiale Phase der insgesamt außerordentlich langsamen Elimination des beta-HCH. In dieser Anfangsphase wurde beta-HCH angenähert gleichförmig aus grauer wie weißer Substanz eliminiert.

6. Aufnahme von alpha-HCH in weiße und graue Substanz in vitro

Alpha-HCH erreichte nach dem Resultat der eben geschilderten Untersuchung bereits drei Stunden nach der Applikation eine etwa vierfach höhere Konzentration im Balken und in den Fasern der Sehbahn als in der Hirnrinde. Dieser Befund veranlaßte eine vergleichende Untersuchung der Akkumulation von alpha-HCH in Rinde und in Balken aus Rattenhirn in vitro.

Aufnahme von alpha-HCH in vitro durch Cortex und Corpus callosum aus Rattenhirn

Abb. 8 Ermittlung der Aufnahmekapazität des Gewebes für alpha-HCH aus 3 ml Medium mit HCH-Anfangskonzentration 1 µg/ml = 3,4 pMol/µl



Ordinate: Alpha-HCH-Gehalt des Gewebes in pMol/mg nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C.
Abszisse: Gewebsmasse pro Ansatz in mg Feuchtgewicht.
Horizontale Linien: Arithmet. Mittel und Standardabweichung der HCH-Konzentration des Gewebes bei Verteilungsgleichgewicht.

Tab. 8 Anreicherung von alpha-HCH im Gewebe bei Verteilungsgleichgewicht

	pMol HCH/mg Gewebe	$\frac{\text{pMol HCH/mg Gewebe}}{\text{pMol HCH/mg Medium}}$
Rinde (N=5)	597,0 ± 37,3	196,5 ± 14,5
Balken (N=6)	971,7 ± 96,0	342,7 ± 27,1
Balken : Rinde	1,63	1,74

Alpha-HCH wurde dafür in einer auf pH 7 gepufferten Salzlösung gelöst und bei 37°C über vier Stunden entweder mit Hirnrindenschnitten oder mit Portionen des Balkens inkubiert. Wegen der sehr geringen Wasserlöslichkeit des alpha-HCH konnte seine Konzentration im Medium nicht erhöht werden. Um das Maximum der HCH-Aufnahme zu erfassen, wurde deshalb die zugesetzte Gewebsmenge, definiert durch das Frischgewicht, sukzessiv verringert. Wie Abb. 8 zeigt, erreichte die HCH-Konzentration in Rindenschnitten ein Limit, wenn die Gewebsmenge, die 3 ml Medium zugesetzt wurde, kleiner war als 5 mg. Bei Ansätzen mit Corpus callosum wurde ein Konzentrationsmaximum erreicht, wenn weniger als 2 mg eingesetzt worden waren. Unter diesen Bedingungen stellte sich ein Verteilungsgleichgewicht für alpha-HCH zwischen Medium und Gewebe ein. Die HCH-Konzentration im Medium nahm nach ein bis zwei Stunden Inkubation nicht mehr ab. Die HCH-Konzentrationen, die nach Einstellen des Gleichgewichts im Gewebe gemessen worden sind, sowie der Grad der Anreicherung der Substanz aus dem Medium in beiden Gewebsarten sind in Tab. 8 aufgeführt. Erwartungsgemäß war der Grad der Anreicherung hoch. Es wurden HCH-Konzentrationen im Gewebe erreicht, die über den in vivo ermittelten lagen. Der Unterschied zwischen weißer und grauer Substanz hinsichtlich des Grades der Anreicherung war jedoch in vitro wesentlich geringer als im lebenden Tier. Er erreichte nicht einmal den Faktor Zwei.

DISKUSSION:

Das Resultat der Arbeit ist zunächst daraufhin zu prüfen, inwieweit es die eingangs gestellten vier Fragen beantwortet.

1. Die quantitative Basis der autoradiographisch festgestellten Anreicherung von alpha-HCH in der weißen Substanz des Rattenhirns

Das Resultat der Gewebsanalysen hat bestätigt, daß sich alpha-HCH in myelinreichen Hirnarealen anreichert. Der Quotient der Konzentration in weißer gegenüber grauer Substanz betrug mindestens 3,5 bis 4.
Die Obertragung der Konzentrationsmessungen dieser Arbeit auf den autoradiographischen Befund muß jedoch die folgenden methodischen Gesichtspunkte berücksichtigen.

1.1. Die Dosierung der Substanz war gleich, aber die Applikationsweise verschieden: Bei der autoradiographischen Untersuchung wurde in die Bauchhöhle, in der vorliegenden Arbeit in den Magen injiziert. Dieser Unterschied fällt jedoch nicht ins Gewicht. Alpha-HCH, in einer Pflanzenöl-Lösung mittels Schlundsonde verabreicht, wird enteral nahezu vollständig resorbiert (ALBRO u. THOMAS, 1974). Andererseits ist die Resorption der Substanz aus einem Depot in der Bauchhöhle, wenn das Depot eine Pflanzenöl-Lösung ist, kein schneller Prozeß. Ein solches Depot enthält 24 Stunden später noch 10 % der HCH-Dosis (KORANSKY u.a., 1963).

1.2. Biotransformationsprodukte des HCH, die in dieser Arbeit nicht gemessen worden sind, beeinflussen den autoradiographischen Befund nur unwesentlich. KORANSKY u.a. (1963) fanden 1, 4 und 7 Tage nach Verabreichung von radioaktiv markiertem alpha-

HCH, daß jeweils über 90 % des in den Organen der Ratte, einschließlich Hirn und Rückenmark, nachweisbaren Markers in Form der unveränderten Ausgangssubstanz vorlagen.

1.3. Mit dem Verfahren, das in dieser Arbeit zur Extraktion von HCH aus kleinen Gewebsproben verwendet worden ist, wurde dem Gewebe zugesetzte Substanz verlustfrei zurückgewonnen. Es wurde allerdings nicht sichergestellt, etwa durch Einsetzen radioaktiv markierter Verbindung, daß HCH auch dann vollständig extrahiert wird, wenn es nach systemischer Verabreichung in das Gewebe eingelagert ist. Jedoch liegt kein Grund vor, eine Bindung von unverändertem HCH an Gewebsbestandteile anzunehmen, die so stark ist, daß der Fehler der Messungen erheblichen Grades sein könnte.

1.4. HCH-Gehalt des Blutes. Zu allen Zeitpunkten, zu denen in dieser Arbeit Konzentrationsmessungen vorgenommen worden sind, lag der alpha-HCH-Gehalt des Blutes erheblich unter dem des Gehirns (vergl. Abb. 6), zum Zeitpunkt 24 Std. nach Applikation z.B. um den Faktor = 15. Die gute Übereinstimmung der Resultate von vergleichenden Konzentrationsmessungen an nativem und an formalinperfundiertem Hirngewebe (Tab. 3) zeigte jedoch an, daß die Analysen an nativem Gewebe durch dessen Blutgehalt nicht entscheidend beeinflußt werden. Dieser Befund ist auch für die Interpretation des autoradiographischen Kontrasts zwischen weißer und grauer Substanz von Bedeutung. Er läßt die Annahme zu, daß die mittlere Strahlungsdichte im Gewebsschnitt nur geringfügig durch den Grad der Vaskularisierung beeinflußt wird, der bei grauer Substanz höher ist als bei weißer.

2. Die Bedeutung der Lipophilie des alpha-HCH für seine Anreicherung in weißer Substanz.

Das Ergebnis der Arbeit deutet darauf hin, daß die Verteilung aus lipidarmen in lipidreiche Phasen des Gewebes nicht die alleinige Ursache der Anreicherung des alpha-HCH in der weißen Substanz sein kann. Zur Erläuterung dieser Schlußfolgerung dient Tabelle 9.
In der Tabelle sind die Gewebskonzentrationen für alpha-HCH, die in dieser Arbeit ermittelt worden sind, dem durchschnittlichen Gesamtlipidgehalt der untersuchten Gewebe gegenübergestellt, und zwar als relative Zahlen, bezogen auf das Blut. Zum Zeitpunkt 3 Std. nach Applikation stimmen die relativen Zahlen für HCH- und Lipid-Gehalt der drei Gewebe befriedigend überein. Die Obereinstimmung geht jedoch verloren während der mehrere Wochen dauernden Elimination. Tabelle 9 zeigt, daß nach 2 Wochen zwar noch Proportionalität zwischen HCH- und Lipidgehalt des Blutes und der grauen Substanz besteht, dagegen eindeutig nicht mehr für Blut und weiße Substanz.

Die relativ langsame Elimination des alpha-HCH aus der weißen Substanz ist im Hinblick auf die relativ geringe Perfusionsrate dieser Gewebsart zu diskutieren. Nach KETYS (1960) Untersuchungen mit 79-Krypton an wachen Katzen ist die Durchblutung von "subcortical white matter", also der Fasern des Balkens, von der Größenordnung 0,2 ml x g^{-1} x min^{-1}, die des Cortex 0,9 - 1,4 ml x g^{-1} x min^{-1}. Dieser Unterschied, der an Ratten wahrscheinlich von ähnlicher Größe ist, wird sowohl die Verteilung des alpha-HCH in Cortex und Balken hinein als auch die Rückverteilung aus beiden Geweben heraus beeinflussen. Man muß jedoch Zweifel daran haben, daß dieser Einfluß sich bis zu dem Grade auswirken kann, der in dieser Arbeit festgestellt wurde. Das Bestehen einer kausalen Beziehung zwischen Perfu-

Tab. 9:

Alpha-HCH und Gesamtlipide in Blut und Gehirn:
Konzentrationen in Blut und weißer Substanz
korrelieren während der Eliminationsphase ungenügend

Relative Zahlen, für Konzentration im Blut = 1

	Gehalt an Gesamtlipiden [1]	Gehalt an alpha-HCH			
Zeit nach Appl.:		3 Std.	24 Std.	7 Tage	14 Tage
Vollblut:	1,0	1,0			
graue Substanz:	9,2	7,2	13,9	6,9	8,1
weiße Substanz:	31,7	30,9	50,1	47,1	79,9

1) Folgende mittlere Konzentrationen wurden zugrundegelegt: Vollblut (Documenta Geigy, 1960): 0,6 (0,4 - 0,7) g/100g; graue und weiße Substanz (Folch-Pi und Le Baron, 1957): 5,5 (5,0 - 6,2) g/100g bzw. 19,0 (16,0 - 22,0) g/100g

2) Konzentration im Blut von Tag 6.

sionsrate und Konzentrationskinetik wird auch durch den Befund (siehe Tab. 7) in Frage gestellt, daß die Konzentration des alpha-HCH in der weißen Substanz schon 3 Std. nach der Verabreichung um den gleichen Faktor über der Konzentration in grauer Substanz liegt wie nach 24 Std. Wenn die geringere Durchblutung der weißen Substanz der entscheidende Grund dafür wäre, daß der Prozeß der Rückverteilung des alpha-HCH innerhalb mehrerer Tage erheblich verzögert wird, dann sollte man erwarten, daß auch der Prozeß der initialen Hinein-Verteilung im Verlauf einiger Stunden so verläuft, daß der Konzentrationsanstieg in der grauen Substanz, der höheren Perfusionsrate wegen, den Konzentrationsanstieg in der weißen Substanz zunächst übertrifft, wie das für viele lipophile Substanzen auch tatsächlich beobachtet wird (z.B. THIOPENTAL: ROTH u. BARLOW, 1961; DIAZEPAM: VAN DER KLEIJN, 1972).
KORANSKY u. ULLBERG stellten in ihrer autoradiographischen Arbeit (1964) ebenfalls fest, daß zu keinem Zeitpunkt nach der Verabreichung von 14-C-alpha-HCH eine intrazerebrale Verteilung des Markers entsprechend der regionalen Durchblutung zu beobachten war.
Aus diesen Gründen wird man vermuten müssen, daß außer dem lipophilen Charakter des alpha-HCH weitere Faktoren die "Affinität" der Substanz zu faserreichen, zellarmen Strukturen des Säugetier-Hirns bedingen. Eine Diskussion möglicher Faktoren erfolgt weiter unten im Zusammenhang mit der Erörterung des Verteilungsverhaltens der anderen HCH-Isomeren.

3. Grobe Lokalisation des Angriffspunktes von alpha-HCH für seine antagonistische Wirkung gegenüber Pentetrazol

Lokale Konzentration eines Stoffes ist für sich allein kein Indiz für lokale Wirkung. Die Größe der Konzentrationsdifferenz, die bei alpha-HCH zwischen synapsenarmen (weiße Substanz) und synapsenreichen (graue Substanz) Strukturen besteht, läßt jedoch eine vorläufige Entscheidung zu. Der zeitliche Verlauf der Pentetrazol-Toleranz nach 200 mg/kg alpha-HCH, wie er von VOHLAND ermittelt worden ist (Abb. 2) korreliert gut mit dem zeitlichen Verlauf der HCH-Konzentration in grauer Substanz. Demgegenüber ist der alpha-HCH-Gehalt der weißen Substanz auch dann noch hoch, wenn Pentetrazol-Antagonismus nicht mehr sicher nachweisbar ist. Diese Feststellungen lassen darauf schließen, daß das Zustandekommen des Wirkungsverlustes von Pentetrazol an die Anwesenheit von HCH in prä- und/oder postsynaptischen Strukturen gebunden ist.

Da auch graue Substanz zahlreiche Axone enthält, muß die Anreicherung des alpha-HCH in der weißen Substanz auf Anreicherung insbesondere in den Myelinscheiden von Axon-Fortsätzen zurückzuführen sein. Ob die Anwesenheit von alpha-HCH im Myelin die Erregungsleitungsfunktion der Axone beeinflußt, ist nicht bekannt. Offenbar hat jedoch ein solcher Einfluß, wenn es ihn gibt, keine entscheidende Bedeutung für die Auslösung der Hemmung chemisch induzierter, generalisierter motorischer Erregung.

4. Die Verteilung der HCH-Isomeren beta und gamma zwischen weißer und grauer Substanz des Rattenhirns

Die vorliegende Untersuchung hat ergeben, daß der Grad der Anreicherung in weißer Substanz bei den HCH-Konfigurationen beta und gamma eindeutig kleiner ist als bei der Konfiguration alpha. Statt mindestens 3,5 - 4 betrug der Konzentrationsquotient weiße : graue Substanz bei gamma-HCH zu allen untersuchten Zeitpunkten nur etwa 2, bei beta-HCH sogar nur wenig mehr als 1. LITTERST und MILLER (1975) fanden am Hund nach i.v. Infusionen von gamma-HCH, die über 30 bis 60 min durchgeführt worden waren, ebenfalls nur die doppelte Konzentration dieses Isomeren in markreichen verglichen mit markarmen Hirnarealen. Die Gewebskonzentrationen, die diese Untersuchung für beta-HCH und gamma-HCH ermittelt hat, sind zwar ebenso, wie oben für das alpha-Isomere bereits erörtert wurde, mit einer methodischen Unsicherheit insofern behaftet, als sie etwas kleiner als die tatsächlichen Konzentrationen sein können. Es ist jedoch ausgeschlossen, daß dieser mögliche Fehler die Größe der regionalen Konzentrationsunterschiede zwischen den Isomeren fälschlich hervorgerufen hat. Die Unterschiede in der intrazerebralen Verteilung sind daher real. Da HCH-Isomere unter physiologischen Bedingungen chemisch wenig reaktiv sind, ist zu prüfen, inwieweit Unterschiede in physikalisch - chemischen Eigenschaften bestehen, die die Differenzen im Verteilungsverhalten verständlich machen.

5. Einige physikalisch - chemische Kennwerte für HCH-Isomere als mögliche Determinanten ihrer Verteilung im Rattenhirn

Die nachfolgende Diskussion berücksichtigt 3 physikalisch - chemische Parameter, die für biologisches Verhalten relevant und für HCH-Isomere vergleichend gemessen worden sind: Löslichkeit, Adsorption und Verteilungskoeffizienten.

5.1. Löslichkeit: Die Löslichkeit der drei hier untersuchten HCH-Isomeren in einigen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität ist in Tabelle 1 bereits angegeben worden.

5.2. Adsorption: Die Löslichkeit von HCH-Isomeren in Wasser wird durch Zusatz von 5 % Rinderserum-Albumin (KURIHARA u.a., 1973) in folgender Weise erhöht: alpha-HCH um den Faktor 20, beta-HCH um den Faktor 50, gamma-HCH um den Faktor 15. KURIHARA u.a. (1973) haben aus diesen Zahlen Bindungskonstanten errechnet. Diese sind, zusammen mit ähnlich ermittelten Bindungskonstanten für Nylon-Pulver in Tabelle 10 aufgeführt. Man erkennt, daß beta-HCH an beide Stoffe 3- bis 4-fach stärker adsorbiert als seine Isomeren.

Der Grund für die stärkere Adsorption des beta-HCH ist nicht bekannt. Im Unterschied zu den anderen Konfigurationen ist die beta-Konfiguration symmetrisch (alle C- Cl-Bindungen sind äquatorial orientiert; vergleiche Abb. 1), d.h. sie ist am geringsten polarisiert oder polarisierbar. Demgegenüber sind in der beta-Konfiguration alle sechs C - H-Bindungen relativ leicht zugänglich. Dies könnte die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu polaren Gruppen an Makromolekülen, die spatial günstig geordnet sind, begünstigen. Bei anderen HCH-Konfigurationen ist die Zahl der möglichen Bindungen dieser Art pro Molekül aus sterischen Gründen eingeschränkt. Interessanterweise liegen die Bindungskonstante für delta-HCH (KURIHARA u.a., 1973) zwischen denen für alpha bzw. gamma einerseits und beta andererseits: 480 für

Adsorption an Rinderserum-Albumin; 320 und 285 für Adsorption an Nylon-Pulver aus 10 % resp. 20 % wässrigem Äthanol. In der delta-Konfiguration ist nur eine C-Cl-Bindung axial orientiert. Die Zugänglichkeit der C-H-Bindungen ist daher gegenüber beta-HCH eingeschränkt, aber nicht in dem Grade wie bei alpha- und gamma-HCH, bei denen 2 resp. 3 benachbarte C-Cl-Bindungen axiale Orientierung haben.

Die Tendenz der HCH-Isomeren zu adsorptiver Bindung wird sich in vivo in Form der Bindung an gelöste und strukturgebundene Makromoleküle auswirken und dadurch Gewebskonzentrationen mitbestimmen. Man ist insbesondere sicherlich berechtigt, im Hinblick auf HCH-Konzentrationen in zentralnervösen Strukturen davon auszugehen, daß sich der Faktor "Bindung an Makromoleküle", insbesondere also Bindung an Proteine, auf die Konzentration in der grauen Substanz in höherem Grade auswirken wird als auf die Konzentration in der weißen Substanz.

An dieser Stelle ist kurz auf die Diskrepanz einzugehen, die in dieser Arbeit hinsichtlich der Anreicherung von alpha-HCH in weißer Substanz zwischen in vivo und in vitro-Experimenten festgestellt worden ist. Der Grad der Anreicherung dieses Isomeren war unter in vitro-Bedingungen erheblich geringer als im lebenden Tier (vergleiche Tab. 8). Die Messungen in vitro sind zwar nach Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwisches Inkubationsmedium und Gewebe vorgenommen worden, jedoch wurde nicht geprüft, etwa durch autoradiographische Untersuchung, ob die Diffusion des alpha-HCH in beide Gewebsarten bis zum vollständigen Konzentrationsausgleich im Schnitt führt. Ein anderer Grund für die Diskrepanz könnte aber auch stärkere Adsorption von alpha-HCH an Strukturen der grauen Substanz in vitro sein. Im isolierten Gewebsschnitt fehlt die kapillare Perfusion, die in vivo für kontinuierlich sich ändernde Konzentrationsgradienten sorgt. Das Fehlen dieses Faktors könnte den Prozeß der Adsorption in vitro begünstigen, so daß die alpha-HCH-Konzentration im Hirnrindenschnitt einen Wert erreicht, der für die Situation, die in vivo besteht, nicht repräsentativ ist.

Tab. 10:

Gleichgewichtskonstanten für die Adsorption von HCH - Isomeren an Rinderserumalbumin und Nylonpulver bei 28°C nach Kurihara u.a. (1973)

	Alpha - HCH	Beta - HCH	Gamma - HCH
5 % Rinderserumalbumin in Wasser :	360	960	280
Nylon-Pulver[1] in wäßrigem Äthanol:			
20 % Äthanol	60	325	80
10 % Äthanol	90	375	110
0 % Äthanol (extrapoliert)	120	425	140

1) 100 und 200 mg 6 - Nylon, ca. 80 mesh, in 10 ml wäßrigem Äthanol

5.3. Verteilungskoeffizienten. In Tab. 11 sind einige Verteilungskoeffizienten aufgeführt, die für HCH-Isomeren ermittelt worden sind. Die Obersicht macht deutlich, daß es Lösungsmittelsysteme gibt, in denen sich alle 3 Isomeren nahezu gleich verteilen (n-Octanol: Wasser, Benzol: Wasser), aber auch solche (n-Heptan: Wasser, n-Hexan: Nitromethan), in denen sich die Verteilungskoeffizienten beträchtlich unterscheiden.
Die Verteilung zwischen n-Octanol und Wasser wird bevorzugt berücksichtigt, um Voraussagen über das biologische Verhalten chemischer Stoffe zu treffen (z.B. LEO u.a., 1971) oder um biologisches Verhalten chemischer Stoffe zu interpretieren.
Die Verteilung der HCH-Isomeren alpha bis gamma zwischen diesen beiden Flüssigkeiten hat ihre näherungsweise Entsprechung in der biologischen Verteilung der drei Substanzen zwischen Adipozyten und Blut (z.B. DAVIDOW und FRAWLEY, 1951; KORANSKY u.a., 1963). Die Verteilungskoeffizienten in diesem System sind jedoch offensichtlich ungeeignet, um die biologische Verteilung der Isomeren in die Lipide des Nervengewebes korrekt vorauszusagen.

6. Versuch einer vorläufigen, kausalen Interpretation der Verteilungsunterschiede zwischen HCH-Isomeren im Rattenhirn

6.1. Beta-HCH. Der Anteil der oralen Dosis beta-HCH, der im Verlauf der initialen Verteilung der Substanz das ZNS erreicht, ist nach dem Resultat dieser Arbeit 4 - 5mal kleiner als der Anteil einer Dosis alpha- oder gamma-HCH. Die Tatsache, daß die Gesamtdosis beta-HCH in 2 Teildosen verabreicht werden mußte, ist in diesem Zusammenhang unerheblich. Nach ALBRO und THOMAS (1974) beträgt die enterale Resorption von beta-HCH aus einer Pflanzenöl-Lösung etwa 80 %. Die Penetration des Stoffes aus oder in einer solchen Lösung durch die Schleimhaut

Tab. 11:

Verteilungskoeffizienten von alpha-, beta- und gamma - HCH

Lösungsmittelsystem	Alpha - HCH	Beta - HCH	Gamma - HCH
n - Octanol : Wasser [1]	6440	6250	5200
Benzol : Wasser [1]	14100	14800	16500
n - Heptan : Wasser [2]	2630	390	1630
n - Hexan : Nitromethan [3]	0,193	0,027	0,130
n - Hexan : Acetonitril [3]	0,308	0,16	0,15

1) Kurihara u.a., 1973
2) Portig, unveröffentlicht
3) Stein, unveröffentlicht

des Magens und des Dünndarms in die Lymphe und in das Blut ist demzufolge nur wenig behindert. Die relativ zu den Isomeren alpha und gamma geringere Penetration des beta-Isomeren in das ZNS muß daher ihre Ursache darin haben, daß die Penetration des Stoffes durch die zellulären Barrieren, die die zerebralen Gefäße umgeben, stärker behindert ist. Zwei der physikalisch-chemischen Eigenschaften des beta-HCH, die oben erörtert worden sind, können die stärkere Behinderung seiner Penetration durch die "Blut - Hirn - Schranke" erklären: Die geringe Löslichkeit in wenig polaren Lösungsmitteln und in Wasser wird die Diffusion sowohl durch hydrophile als auch durch hydrophobe Regionen der "Schranke" verlangsamen. Zusätzlich wird die stärkere Tendenz zur Adsorption an Makromoleküle sowohl im Blut wie in Endothelzellen und Astrozyten die Zahl diffusibler Moleküle herabsetzen.

Die Adsorption von beta-HCH an gelöste und strukturgebundene Makromoleküle der Nervenzell-Somata und Gliazellen, die dem in vitro-Verhalten entsprechend stärker sein wird als vergleichbare intermolekulare Bindungen der Isomeren alpha und gamma, wird wahrscheinlich auch dazu beitragen, daß der Konzentrationsunterschied zwischen weißer und grauer Substanz in vivo nur geringfügig ist.

6.2. Gamma-HCH. Gamma-HCH unterscheidet sich weit weniger als beta-HCH vom alpha-Isomeren in bekannten physikalisch-chemischen Eigenschaften. Seine Löslichkeit ist allerdings generell besser als die des alpha-Isomeren, insbesondere auch die Löslichkeit in Wasser und zwar um den Faktor 3 - 4 (siehe Tab. 1). Diese Eigenschaft ist für die intrazerebrale Verteilung wahrscheinlich wichtig wegen des größeren Wassergehaltes von grauer gegenüber weißer Substanz (81 - 87 % gegenüber 67 - 74 % nach FOLCH-PI und LE BARON, 1957). Unter sonst gleichen Bedingungen sollte diese Differenz zur Folge haben, daß graue Substanz absolut mehr gamma- als alpha-HCH aufzunehmen vermag.

Die vergleichende Messung der Konzentration der drei HCH-Isomeren in einigen subkortikalen Strukturen (siehe Tab. 6) 24 Std. nach Applikation ergab darüber hinaus jedoch einen klaren Hinweis darauf, daß sich gamma-HCH anders regional verteilt, als das für viele "lipotrope" Substanzen typisch ist. Die Abweichung war insbesondere darin zu sehen, daß der Hypothalamus etwa genau so viel gamma-HCH enthielt wie der Cortex. Bei alpha-HCH und beta-HCH dagegen war ein signifikanter Unterschied festzustellen, und zwar lag der HCH-Gehalt des Hypothalamus unter dem der Rinde. Dies entspricht der regionalen Verteilung, die z.B. für Thiopental (ROTH und BARLOW, 1961), Imipramin (HOPF und ECKERT, 1969), Diazepam (VAN DER KLEIJN, 1971), Thioridazin (ECKERT und HOPF, 1971) gefunden worden ist. Auch Striatum, Thalamus, Hippocampus hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung einen gamma-HCH-Gehalt, der, relativ zur Konzentration im Cortex, höher lag, als bei den Isomeren alpha und beta.
Diese Befunde könnten darauf zurückzuführen sein, daß gamma-HCH stereoselektiv an Bestandteile von Nervenzellsomata, von präsynaptischen Axonabschnitten und/oder von Dendriten, aber auch von Gliazellen gebunden wird. Für stereoselektive Erkennung der HCH-Konfiguration gamma durch subzelluläre Elemente gibt es einen biochemischen Beleg. Während alle HCH-Isomeren der Hydroxylierung durch mikrosomale Monooxygenasen unterliegen (STEIN u.a., 1977; TANAKA u.a., 1977), wird gamma-HCH als einziges der Isomeren durch diese Enzyme außerdem dehydrogeniert (TANAKA u.a., 1977). Diese Reaktion hat erhebliche Bedeutung für die Biotransformation von gamma-HCH in vivo (CHADWICK u.a., 1975; PISTOR, 1977). Die akute Toxizität des gamma-HCH durch Auslösung generalisierter motorischer Erregung, durch die es sich von den anderen Isomeren auszeichnet, kann sowieso nur darauf beruhen, daß bestimmte neuronale Elemente zu stereoselektiver Wechselwirkung mit der gamma-Konfiguration fähig sind.

6.3. Alpha-HCH. Die Befunde dieser Arbeit mit alpha-HCH lassen, wie oben dargelegt worden ist, die Vermutung berechtigt erscheinen, daß dieses Isomere eine besondere "Affinität" zu Bestandteilen des Myelin besitzt. Die intrazerebrale Verteilung des Stoffes in der Invasionsphase entspricht zwar formal einer Verteilung in die Lipide, jedoch sollte die in vitro erkennbare, durchaus nicht unerhebliche Tendenz des alpha-HCH zur Adsorption an Makromoleküle die Größe des Konzentrationsunterschiedes zwischen grauer und weißer Substanz unter den Wert herabmindern, der sich aus der Differenz im Gesamtlipidgehalt zwischen beiden Gewebsarten formal ableiten läßt.
Die Ursache für die "Affinität" dieses Isomeren zu Myelin ist vermutlich ebenfalls in seiner sterischen Konfiguration zu suchen. Einen hypothetischen Ansatzpunkt für eine Erklärung bietet die Tatsache, daß alpha-HCH chiral gebaut und das Razemat zweier enantiomerer Konfigurationen ist (CRISTOL, 1949; MONSTER, 1974). Es wäre experimentell zu prüfen, ob sich die optischen Antipoden des alpha-HCH verschieden stark in der weißen Substanz anreichern. Die bedeutsamere Frage ist allerdings die, welcher Bestandteil des Myelin die besondere Affinität bedingt.

7. HCH-Isomere als Antagonisten des Pentetrazol

Wie oben dargelegt worden ist, kann man dem Resultat dieser Untersuchung den Hinweis entnehmen, daß alpha-HCH wahrscheinlich an Strukturen grauer Substanz wirkt, wenn es die Wirksamkeit des Analepticums Pentetrazol herabsetzt. Für die Isomeren beta und gamma ist eine ähnliche Folgerung aus den Meßergebnissen nicht ableitbar. Es ist jedoch legitim, für diese Isomeren einen prä und/oder postsynaptischen Angriffspunkt analog zu postulieren. Dennoch bleibt die entscheidende Frage offen, in welcher Struktur oder in welchen Strukturen der Wirkort oder die Wirkorte lokalisiert sind. Trotz unzureichender Kenntnis

des Angriffspunktes ist es von Interesse, die Konzentrationsmessungen dieser Arbeit (Tab. 5) im Gesamthirn mit der Quantifizierung des Pentetrazol-Antagonismus (VOHLAND u.a., 1972; VOHLAND, 1977) zu vergleichen. Der Vergleich ist zulässig, weil in beiden Versuchsreihen Dosierung und Applikationsart der HCH-Isomeren gleich gewesen sind.
Beide Meßreihen enthalten Angaben für den Zeitpunkt 24 Stunden nach HCH-Verabreichung. Zu diesem Zeitpunkt ist, wie die Abb. 2 demonstriert, die antagnostische Wirkung gegenüber Pentetrazol für alle drei untersuchten HCH-Isomeren, im besonderen auch für gamma-HCH, signifikant nachweisbar. Gibt man den Grad des Pentetrazol-Antagonismus als Quotienten aus mittlerer i.v. Testdosis und mittleren i.v. Kontrolldosis des Analepticums an, so beträgt dieser zum Zeitpunkt 24 Stunden für alpha- und gamma-HCH 1,67, für beta-HCH 1,35. Bezogen auf die applizierte HCH-Dosis wäre beta-HCH demnach knapp halb so wirksam wie alpha-HCH, während gamma-HCH etwa dreifach wirksamer ist als das alpha-Isomere. Nimmt man die durchschnittliche HCH-Konzentration im Gesamthirn als Bezugsgröße, so bleibt der Wirksamkeitsunterschied zwischen alpha- und gamma-HCH praktisch unverändert, weil der Konzentrationsunterschied, der bei diesen Isomeren im Gehirn besteht, dem Dosisunterschied sehr genau entspricht. Beta-HCH erweist sich als de facto ebenfalls erheblich - etwa zweieinhalbfach - wirksamer als alpha-HCH, weil seine Konzentration im Gehirn trotz gleicher Dosis etwa fünffach geringer ist.
Wenn auch das numerische Ergebnis dieses sehr groben Wirksamkeitsvergleiches sicherlich korrigiert werden muß, sobald Konzentrationsmessungen am Wirkort oder an den Wirkorten des HCH vorgenommen werden können, so hat doch der Befund, daß zwischen den Isomeren Differenzen in der pentetrazol-antagonistischen Wirksamkeit bestehen, vermutlich einen realen Hintergrund.

Allerdings bleibt der auffällige Tatbestand zu klären, weshalb der Effekt des beta-HCH nach 7 Tagen praktisch aufgehoben ist (Abb. 2), obwohl seine Konzentration im Gehirn zu diesem Zeitpunkt nur wenig unter den 24-Stunden-Wert abgesunken ist, während andererseits gamma-HCH, dessen Konzentration im gleichen Zeitraum um fast 90 % absinkt, trotzdem nach 7 Tagen noch signifikant pentetrazol-antagonistisch wirksam ist. Für eine exaktere Analyse dieser Sachverhalte ist daher wahrscheinlich nicht nur die Kenntnis des Wirkortes bzw. der Wirkorte wichtig, sondern auch die Klärung der Frage, inwieweit Stoffwechselprodukte der verschiedenen Isomeren am Zustandekommen und an der Aufrechterhaltung des Pentetrazol-Antagonismus beteiligt sind. Für gamma-HCH ist überdies die Möglichkeit zu prüfen, ob die exzitatorische Wirkkomponente dieser Substanz endogene, erregbarkeitsmindernde, neuronale Mechanismen aktiviert, die den Wirkungsverlust des Analepticums mit verursachen.

LITERATURVERZEICHNIS

ALBRO, P.W., R. THOMAS:
Intestinal absorption of hexachlorobenzene and hexachlorocyclohexane isomers in rats.
Bull. Environm. Contamin. Toxicol. 12, 289-294 (1974)

BENDER, H.:
zitiert nach ULMANN,E. (s. dort), S. 13

CHADWICK, R.W., L.T. CHUANG, K. WILLIAMS:
Dehydrogenation:A previously unreported pathway of lindane metabolism in mammals.
Pestic. Biochem. Physiol. 5, 575-586 (1975)

CRISTOL, S.J.:
The structure of - benzene hexachloride.
J. Amer. Chem. Soc. 71, 1894 (1949)

DAVIDOW, B., P. FRAWLEY:
Tissue distribution, accumulation and elimination of the isomers of benzene hexachloride.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, 780-783 (1951)

ECKERT, H., A. HOPF:
Die regionale Verteilung von radioaktivem Thioridazin im Gehirn.
Triangel 10, 113-118 (1971)

FOLCH-PI, J., F.N. LE BARON:
Chemical composition of the mammalian nervous system.
In: Metabolism of the nervous system, ed. D. RICHTER, Acad. Press, NY 1957, pp. 67-71

HERKEN, H.:
Änderung von Zellfunktionen im Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 143-150 (1950)

HOPF, A., H. ECKERT:
Autoradiographic studies on the distribution of psychoactiv drugs in the rat brain
II. ^{14}C-Imipramine.
Pharmakopsych. Neuro-Psychopharmakol. 2, 1-14 (1969)

KETY, S.:
The cerebral circulation.
In: Handbook of Physiology, vol. III, section 1, Neurophysiology, chapter 71.
J. FIELD, H.W. MAGOUN, V.E. HALL, eds. WASHINGTON, D.C., American Physiological Society, 1960

KORANSKY, W., S. ULLBERG:
Distribution in the brain of ^{14}C-benzene-hexachloride: Autoradiographic study.
Biochem. Pharmacol. 13, 1537-1538 (1964)

KORANSKY, W., J. PORTIG, G. MONCH:
Resorption, Verteilung und Ausscheidung von α- und γ-Hexachlorcyclohexan.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 244, 564-575 (1963)

KURIHARA, N., M. UCHIDA, T. FUJITA, M. NAKAJIMA:
Studies on BHC isomers and related componends V Some physicochemical properties of BHC isomers.
Pestic. Biochem. Physiol. 2, 383-390 (1973)

LEO, A., C. HANSCH, C. CHURCH:
Composition of parameters currently used in the study of structure-activity relationships.
J. Med. Chem. 12, 766-771 (1969)

LITTERST, C., E. MILLER:
Distribution of Lindane in brains of dogs at the onset of Lindane-induced convulsions.
Bull. Environment. Contam. Toxicol. 13, 619-624 (1975)

MONSTER, J.:
Zum chemischen und biologischen Verhalten von -1.2.3.4.5.6-Hexachlorcyclohexan und seinem Monodehydrochlorierungsprodukt -1.3.4.5.6-Pentachlorcyclohexen-(1).
Inaug.-Diss. Fachbereich Humanmed., Philipps-Universität Marburg, 1974

PISTOR, R.:
Unveröffentlichte Versuche (1977)

ROTH, L.J., C.F. BARLOW:
Drugs in the brain.
Science 134, 22-42 (1961)

STEIN, K., J. PORTIG, W. KORANSKY:
Oxidative transformation of hexachlorcyclohexane in rats and with rat liver microsomes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 115-128 (1977)

TANAKA, K., N. KURIHARA, M. NAKAJIMA:
Pathways of chlorophenol formation in oxidative biodegradation of BHC.
Agric. Biol. Chem. 41, 723-725 (1977)

ULMANN, E. (Herausg.):
Lindane.
Verlag K. Schillinger, Freiburg i. Br., 1972, S. 16

UCHIDA, M., Y. IRIE, N. KURIHARA, T. FUJITA, M. NAKAJIMA:
The neuroexitatory, convulsive and lethal effects of lindane analogs on Periplaneta americana (L.).

VAN DER KLEIJN, E.:
Pharmacokinetics of distribution and metabolism of ataractic drugs and an evaluation of the site of antianxiety activity.
Ann. New York Acad. Sci. 179, 115-125 (1971)

VAN VLOTEN, G.W., Ch.A. KRUISSINK, B. STRIJK, M. BIJVOET:
The crystal structure of "gammexane", -$C_6H_6Cl_6$.
Acta Cryst. 3, 139-143 (1950)

VOHLAND, H.W.:
Unveröffentlichte Versuche (1977)

VOHLAND, H.W., W. KORANSKY, H. ZUFELDE:
Effect of α-hexachlorocyclohexane on the convulsive activity of pentetrazol (Cardiazol^R) in the rat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 289-298 (1972)

VOHLAND, H.W., W. KORANSKY:
Effect of α-hexachlorocyclohexane on metabolism and excretion of pentetrazol (Cardiazol^R) in the rat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 99-298 (1972)

Nachtrag zum Literaturverzeichnis

Nach Abfassung des Manuskripts erhielt der Verfasser Kenntnis von folgender Publikation:

NAKAJIMA, E., H. SHINDO, N. KURIHARA:
Whole body autoradiographic studies on the distribution of α-, β- and γ-BHC-^{14}C in mice.
Radioisotopes, 19, 532-538 (1970).

Die Arbeit ist in japanischer Sprache abgefaßt; eine Übersetzung des Textes liegt noch nicht vor. Die Autoren haben jedoch auf Anfrage freundlicherweise mit englischen Kurzlegenden versehene Kopien der Autoradiogramme, die ihre Studie ergeben hat, zur Verfügung gestellt. Die nach intraperitonealer Injektion der HCH-Isomeren beta und gamma an Mäusen gewonnenen Ganzkörperautoradiographien zeigen Details der intracerebralen Verteilung nur ungenügend, so daß ein Vergleich mit den Befunden der hier vorgelegten Arbeit nicht möglich ist. Demgegenüber ist eine Anreicherung des alpha-HCH in myelinreichen Arealen des Gehirns zweifelsfrei erkennbar, und zwar war sie in dieser Studie bereits 5 min. nach der Applikation eindeutig festzustellen.

Für die sehr hilfreiche Anleitung und für die jederzeit gehabte Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof.Dr.J.Portig bedanken.
Bei Herrn Prof.Dr.W.Koransky möchte ich mich ebenfalls für seine freundliche Unterstützung und dafür bedanken, daß ich in seinem Institut diese Arbeit machen konnte.

LEBENSLAUF

Am 21.12.1946 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Bruno Fuhrmann und seiner Frau Vera Fuhrmann geb. Baesigk in Obergünzburg/ Kreis Marktoberdorf geboren. Von 1953-57 besuchte ich die Volksschule in Buchloe. Danach bis 1959 das Oberrealgymnasium in Kaufbeuren. Von 1959 - 66 das Staatl. Math. Naturw.Gymnasium in Landau/Pfalz, an welchem ich am 21.10.66 die Reifeprüfung ablegte. Mit dem Sommersemester 67 begann ich an der Philipps-Universität das Medizinstudium. Nach dem Vorphysikum 67/68 und dem Physikum 69 studierte ich noch 4 klinische Semester an der Universität Marburg. 1970 konnte ich an der Universitätsklinik in Warschau famulieren. Von Oktober 71 bis Juli 72 wechselte ich an die Universität Paris, wo ich am Hopital de la Salpetriere und dort insbesondere im Institut für Neurochemie studiert habe. Nach meinem Studienaufenthalt in Paris absolvierte ich nochmals ein klinisches Semester in Marburg und legte am 14.8.1973 das Staatsexamen ab. In Marburg hatte ich in der zweiten Hälfte meines klinischen Studiums bei Herrn Prof.Dr.Portig im Institut für Toxikologie und Pharmakologie diese hier vorliegende Doktorarbeit aufgenommen. Am 1.9.73 verheiratete ich mich mit Frl. Joelle van Ghele.
Medizinalassistenzzeit für Innere Medizin und Chirurgie von Okt. 73 - Juni 74 im Stadtkrankenhaus Siegen. Von Juli 74 bis Feb. 75 war ich als Assistent bei Prof. Schulze in der Neurochirurgischen Klinik im Ev.Jung-Stilling Krankenhaus in Siegen tätig. Danach folgte meine Wehrdienstzeit als Stabsarzt beim Beobachtungsbataillon 2 in Stadt-Allendorf bis Mai 76. Von Juni 76 bis März 77 war ich dann wieder in der Neurochirurgischen Klinik als Assistenzarzt tätig. Seit dem 1.4.77 bin ich als Assistent in der Neurologischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Schliack beschäftigt.
Am 17.2.78 wurde unser erster Sohn Alexandre in Hannover geboren. Ich strebe eine Facharztausbildung für Neurologie und Endocrinologie an. Wissenschaftlich beschäftige ich mich hauptsächlich mit Schilddrüsenhormonwirkungen am Zentralnervensystem.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

In Marburg: Berendes, Buchholz, Dimroth, Dölle, Doss, Friedrich, Graul, Hamelmann, Hensel, Hort, Karlson, Koransky, Linneweh, Martini, Nöth, Nultsch, Petry, Portig, Pots, Rodeck, Rohen, Schleyer, Siegert, Straub, Voss, Walcher

In Paris: Baumann, Castaigne, Escourolle, Laplane, Schuller